

原 著

食道粘膜細胞修復における HGF (Hepatocyte Growth Factor) の役割と NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) の作用

獨協医科大学越谷病院 消化器内科

高田 博信 高橋 盛男 岡 茂樹

要 旨 食道粘膜傷害の発生機序と粘膜修復機転の解明は、臨床的に逆流性食道炎に代表されるような重要な課題であるにもかかわらず、そのメカニズムは十分検討されていない。我々は、これまで消化管の粘膜障害の再生機転を、cyclooxygenase-2 (COX-2) 発現→prostaglandin (PG) 産生→hepatocyte growth factor (HGF) →修復という一連の過程を仮説として提唱してきた。そこで培養食道上皮細胞を用いて COX-2, PG, HGF を測定して、消化管粘膜の代表的障害因子であるステロイドと非ステロイド系消炎鎮痛薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; 以下, NSAIDs) の食道修復に与える影響について検討した。培養扁平上皮細胞に欠損部を作成し修復速度を観察すると、細胞修復はステロイドや NSAIDs により抑制された。これら抑制された上皮修復は外因性 HGF により回復した。PG の遊離に関しても各薬剤によりその遊離が阻害された。HGF の発現はステロイド, NSAIDs により抑制された。これに対しステロイドは COX-2 の発現を抑制したが、NSAIDs は COX-2 の発現を抑制しなかった。これらの結果よりステロイドは COX-2 の発現を抑制し、また NSAIDs は PG 遊離を抑制することにより培養食道細胞の修復が阻害されたものと考えられた。

Key Words : 食道粘膜修復, ステロイド, NSAIDs, COX-2, HGF

緒 言

現在、逆流性食道炎の治療に対して H₂ 受容体拮抗薬やプロトンポンプインヒビターなどの胃酸分泌抑制薬が効果的であることが知られている。しかしながら、一旦、治癒しても服薬の中断で短期間の中に再発が高頻度に起こることが示されている^{1~5)}。逆流性食道炎が注目されているのは治癒、再発を繰り返す過程で食道腺癌の発生母地として重要な Barrett 上皮が生じるためである^{6~9)}。逆流性食道炎の多い欧米では、Barrett 上皮が発生母地と考えられる食道腺癌が急増しており、扁平上皮癌よりも多い^{10~12)}。

我が国では、食道癌の組織型は扁平上皮癌が圧倒的に多いが、近年、逆流性食道炎の罹患頻度の増加が指摘さ

れていることから^{13~15)}、日本でも食道腺癌の増加が危惧されている。食道腺癌の発生母地として重要である Barrett 上皮の発生は、食道粘膜の障害と修復の繰り返しの過程に因って起こると考えられている¹⁶⁾。このような状況のなかで食道粘膜の修復機転を解明することは重要である。

非ステロイド系消炎鎮痛薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; 以下, NSAIDs) とステロイドは胃や大腸などの消化管粘膜傷害の原因として最も重要なものの一つである。しかし、食道粘膜傷害については十分検討されていない。事実、これまでの検討でも NSAIDs は食道粘膜傷害の原因のひとつとして注目されている^{17~20)}。

我々は以前から、食道粘膜修復における酸の影響について培養細胞系を用いた研究結果を報告してきた²¹⁾。また、これまでの研究において粘膜細胞の再生に基本的役割を果たす Hepatocyte Growth Factor (HGF) は胃線維芽細胞より産生され、その作用はプロスタグランディン (prostaglandin : 以下, PG) により用量依存的に増加す

平成 15 年 11 月 6 日受付, 平成 15 年 12 月 8 日受理

別刷請求先 : 高田博信

〒 343 - 8555 埼玉県越谷市南越谷 2 - 1 - 50

獨協医科大学越谷病院 消化器内科

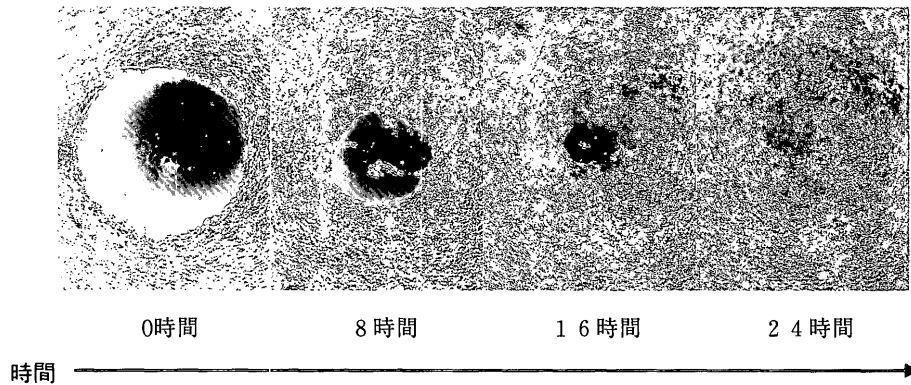


図1 円形欠損作成直後、8時間後、16時間後、24時間後と時間をおってを上皮を位相差顕微鏡により40倍の拡大率でデジタルカメラを用いて撮影した。時間の経過に伴い欠損部分が修復された。

る。実際、線維芽細胞と上皮細胞を共培養すると上皮細胞の修復がPGにより促進されることを胃粘膜上皮細胞において明らかにした²²⁾。また、消化管粘膜細胞の修復機転において重要な役割を果たしているシクロオキシナーゼ-2 (cyclooxygenase-2: 以下, COX-2) の発現誘導因子であるインターロイキン-1 α (Interleukin-1 α : 以下, IL-1 α) やインターロイキン-1 β (Interleukin-1 β : 以下, IL-1 β)、あるいは tumor necrosis factor α (以下, TNF α) により、培養細胞の上皮修復が促進されること、同時にこれらの作用はCOX阻害剤であるNSAIDsにより抑制されることを明らかにした²²⁾。また食道粘膜再生過程においてもHGFが重要な役割を演じることを報告してきた²³⁾。そこで今回、我々は食道上皮細胞と線維芽細胞の共培養系を用いて、ステロイドとNSAIDs存在下におけるHGFとPGを測定し、食道粘膜細胞の修復に与えるステロイドとNSAIDsの影響を検討した。

方 法

食道上皮細胞

食道上皮は2.5 - 3.0 Kgの雄の日本白兎の食道を摘出し、外科用メスで上皮を筋層より剥離した。この上皮を1mm以下の大きさに細切しコラゲナーゼを0.35 mg/mlの濃度で溶解したBasal medium Eagle (SIGMA-ALDRICH) 中で、20分間37℃定温振盪し洗浄した。この操作を二回繰り返し、洗浄した上皮を培養液 (Ham's F12/10% FBS) に混合しディッシュに加え37℃のCO₂インキュベーター中で48時間培養し、食道粘膜細胞と食道線維芽細胞の共培養を作製した²³⁾。

投与薬

ステロイドはデキサメタゾン、NSAIDはCOX-2選択

的阻害薬であるNS-398、エトドラク、COX阻害薬であるスリンダクを使用した。これらを培養液 (Ham's F12/0.1% BSA/2% FBS) 中にデキサメタゾンは0.16 mM, 1 mM, NS-398は20 μ M, 200 μ M, エトドラクは20 μ M, 200 μ M, スリンダクは10 μ M, 100 μ Mの濃度で溶解し培養細胞に使用した。

修復の評価

細胞の修復は、単層培養細胞にデキサメタゾンまたはNSAIDを投与しスクレーパーを用いて培養細胞に径1 mmの円形欠損を作成した²³⁾。円形欠損作成直後、8時間後、16時間後、24時間後と時間をおって培養細胞を位相差顕微鏡により40倍の拡大率でデジタルカメラを用いて撮影した。撮影された写真の円形欠損部分をAdobe Photoshop (Adobe Systems) で抽出しデジタルデータとした。これらのデータを米国 NIH (National Institute of Health) よりパブリックドメインとして供給されている画像解析ソフトであるNIH Imageで面積を測定した。円形欠損作成直後の面積を100%とし、それぞれの時間において統計学的にコントロールと比較して欠損面積が有意に減少したものを修復促進と評価した (図1)。

PG測定

PGはCayman Chemical社製のProstaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonalを用い、ELISA法にて欠損を作製していない正常細胞上清のPG E₂を測定した。

HGF, COX-2測定

HGF, COX-2 mRNAは、48時間培養した食道粘膜細胞と食道線維芽細胞の共培養に炎症性サイトカインであるIL 1 α , β , TNF α (各濃度10 ng/ml) を投与し刺激

$T = X \times 2^{cc}$ COX-2	$T = X' \times 2^{ch}$ HGF	T: SET QUANTITY OF PCR PRODUCT X: COX-2 mRNA ORIGINAL QUANTITY X': HGF mRNA ORIGINAL QUANTITY Y: GAPDH mRNA ORIGINAL QUANTITY cc: NUMBER OF CYCLE FOR COX-2 ch: NUMBER OF CYCLE FOR HGF cg: NUMBER OF CYCLE FOR GAPDH
$T = Y \times 2^{cg}$ GAPDH	$T = Y \times 2^{cg}$ GAPDH	
$X/Y = 2^{cg}/2^{cc} = 2^{(cg-cc)}$	$X'/Y = 2^{cg}/2^{ch} = 2^{(cg-ch)}$	

図2 GAPDHをスタンダードとし、各サンプルのGAPDHに対する比率を算出した。

した5時間後に、TaqMan法 (ABI PRISM 7700: Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)^{24, 25)}により測定した。各検体はRNA抽出キット (ISOGEN: NIPPON GENE)でRNAを抽出し、逆転写酵素 (Super Script II: invitrogen)でRNAからcDNAを合成した。HGFとCOX-2のTaqMan probeおよびprimer配列の設計は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemに付属するPrimer Expressソフトウェアを用いて行なった。(Sense primer for COX-2: TTT GCA TTC TTT GCC CAG C; antisense primer COX-2: GGG AGG ATA CAT CTC TCC ATC AAT; TaqMan probe for COX-2: ACT CTG GCT AGA CAG CGT AAA CTG CGC; sense primer for HGF: ATG CAT GAC CTG CAA TGG G; antisense primer for HGF: GAG TAT AGC ACC ATG GCC TCG; TaqMan probe for HGF: TCA TCA GAC ACC ACA CCG GCA CAA)。PCRは、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いて95℃, 15秒→58℃, 90秒の反応条件を40サイクル行なった。GAPDHをスタンダードとして用いた。PCRによる増幅がリアルタイムでモニタリングされ、スタンダードの増幅曲線 (Y軸をlog scaleで表示)が指数関数的に起こる領域で、一定の増幅産物量になるサイクル数 (Threshold Cycle)を以下に示す公式に代入し各サンプルのGAPDHに対する比率を算出し比較した (図2)。

$$X/Y = 2^{cg}/2^{cc} = 2^{(cg-cc)} \quad X'/Y = 2^{cg}/2^{ch} = 2^{(cg-ch)}$$

T: SET QUANTITY OF PCR PRODUCT
 X: COX-2 mRNA ORIGINAL QUANTITY
 X': HGF mRNA ORIGINAL QUANTITY
 Y: GAPDH mRNA ORIGINAL QUANTITY
 cc: NUMBER OF CYCLE FOR COX-2
 ch: NUMBER OF CYCLE FOR HGF
 cg: NUMBER OF CYCLE FOR GAPDH

統計学的解析

各データは平均値±標準誤差で表記し、コントロール

と各濃度の薬剤群間、各濃度の薬剤群間の有意差の検定にはFisher's PLSD法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

① 細胞修復

デキサメタゾン0.16 mM-1 mMの濃度で濃度依存的に食道粘膜細胞の修復を抑制した (図3)。

NS-398は20 μM-200 μMの濃度で食道粘膜細胞の修復を抑制し、濃度依存的に食道粘膜細胞の修復を抑制する傾向にあった。エトドラク (20 μM-200 μM)、スリダク (10 μM-100 μM)も同様に、各濃度で食道粘膜細胞の修復を抑制し、濃度依存的に食道粘膜細胞の修復を抑制する傾向にあった (図4, 図5, 図6)。

更にデキサメタゾンを投与した系において、HGF (5 ng/ml)を添加すると、各濃度ともデキサメタゾンにより抑制された食道粘膜細胞の修復は、回復した。また、各NSAIDsを投与した系においても、HGF (5 ng/ml)を添加すると、同様にNSAIDsにより抑制された食道粘膜細胞の修復は回復した (図7)。

② PGの遊離

デキサメタゾン0.16 mM-1 mM投与にて、各時間ともコントロールに比べてPG E₂の遊離が抑制され、濃度依存的にPG E₂の遊離を抑制する傾向にあった (図8)。

NS-398 20 μM-200 μMの濃度においても、PG E₂の遊離が抑制された。エトドラク (20 μM-200 μM)、スリダク (10 μM-100 μM)においても同様に、有意にPG E₂の遊離が抑制され、各NSAID共に濃度依存的にPG E₂の遊離を抑制する傾向にあった (図9, 図10, 図11)。

③ HGF mRNA, COX 2 mRNAの発現

食道線維芽細胞をIL 1 α, β, TNF α (各濃度10 ng/ml)で刺激するとHGF mRNAは著明に発現促進した。デキサメタゾン1 mM, ならびにNS-398 20 μM,

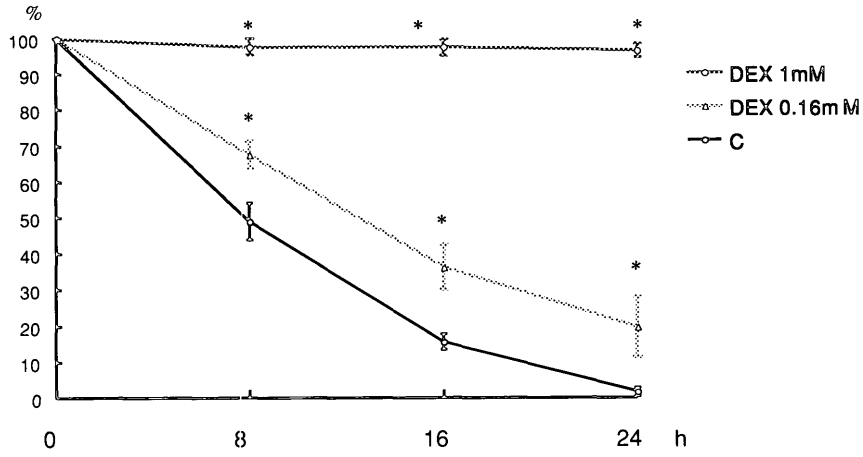


図3 デキサメタゾン投与下では、コントロールに比べて、濃度依存的に培養食道細胞の修復が抑制された。 (* : $p < 0.05$)

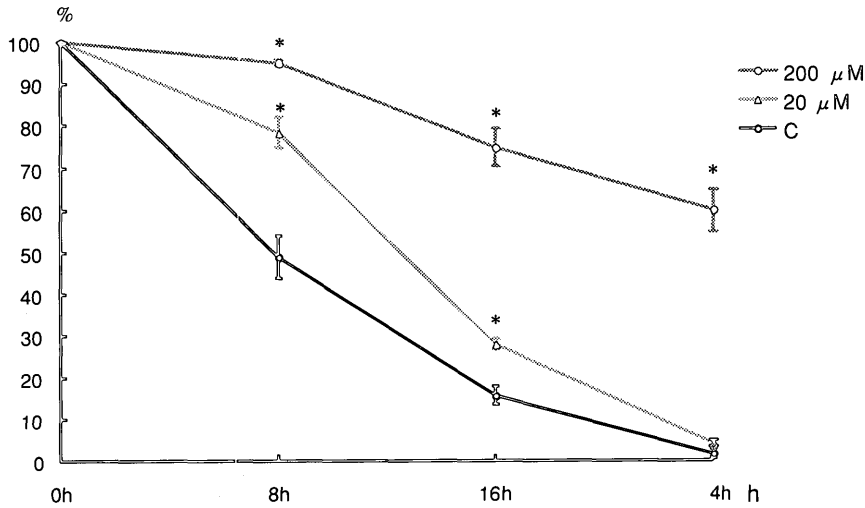


図4 NS-398投与下においてコントロールに比べて、培養食道細胞の修復が抑制された。 (* : $p < 0.05$) また、濃度依存的に培養食道細胞の修復を抑制する傾向にあった。

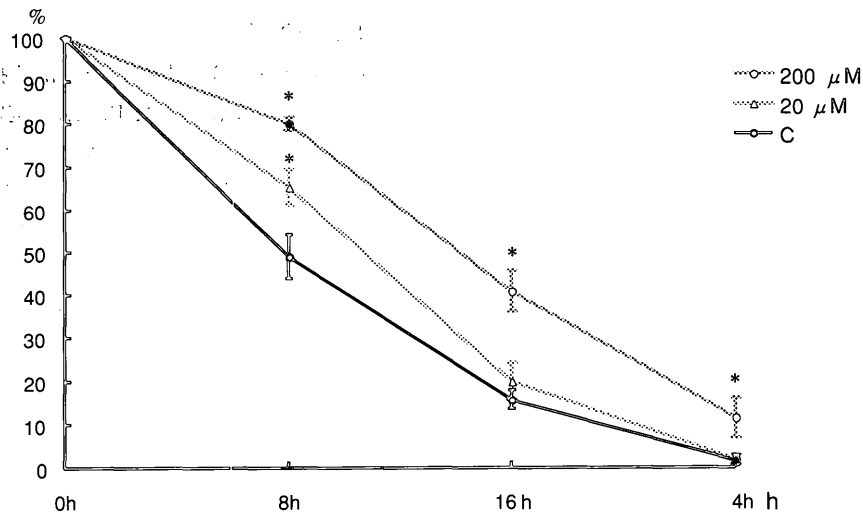


図5 エトドラク投与下においてコントロールに比べて、培養食道細胞の修復が抑制された。 (* : $p < 0.05$) また、濃度依存的に培養食道細胞の修復を抑制する傾向にあった。

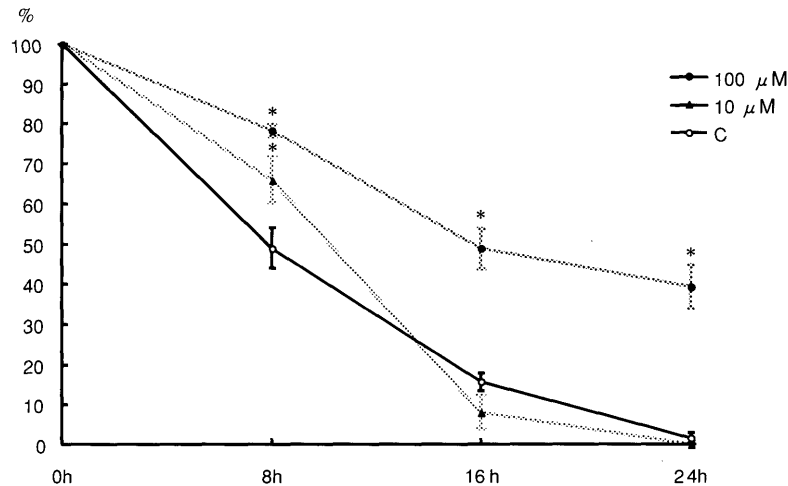


図6 スリンダク投与下においてコントロールに比べて、培養食道細胞の修復が抑制された。(*: $p < 0.05$)

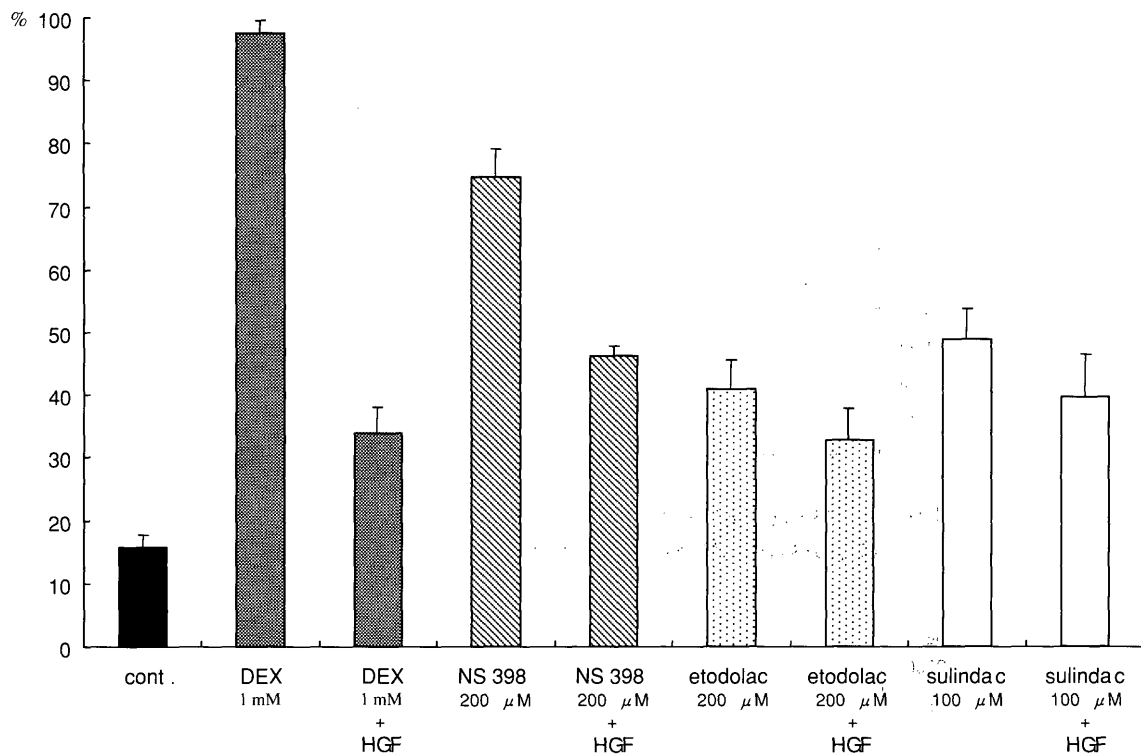


図7 デキサメタゾン (DEX) を投与した系において、HGFを添加すると、各濃度ともデキサメタゾンにより抑制された食道細胞の修復は、HGFにより回復した。同様にNS-398、エトドラク、スリンダクの各NSAIDを投与した系においても同様に抑制された食道細胞の修復は、HGFにより回復した。(*: $p < 0.05$)

エトドラク 20 μM , スリンダク 10 μM はそれぞれは促進した HGF mRNA の発現を抑制した。(図 12) これに対し COX 2 mRNA の発現に関しては、デキサメタゾンは COX 2 mRNA の発現を抑制したが、各 NSAIDs は COX 2 mRNA の発現を抑制しなかった (図 13)。

考 察

食道上皮は主に三層よりなる。つまり胚芽層、棘細胞層、角質層であるが、細胞は下層の胚芽層でつくられ管腔側に移動していく。移動に伴って細胞は分化、成熟する。角質層に到達した成熟細胞は細胞質にグリコーゲンを含んでいる。これは臨床的には食道上皮がヨード染色

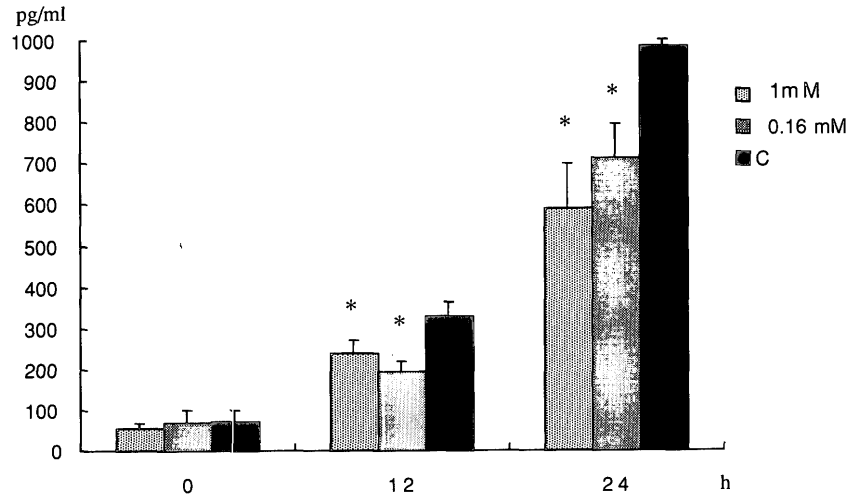


図8 デキサメタゾン投与下におけるPGの遊離は、各時間ともコントロールにくらべPGの遊離が抑制された。（*： $p < 0.05$ ）また、濃度依存的にPGの遊離を抑制する傾向にあった。

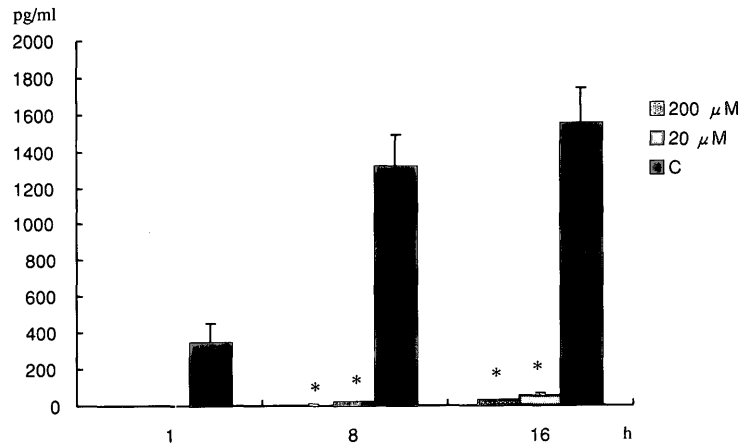


図9 NS-398投与下におけるPGの遊離は、各時間ともコントロールにくらべ著明にPGの遊離が抑制された。（*： $p < 0.05$ ）

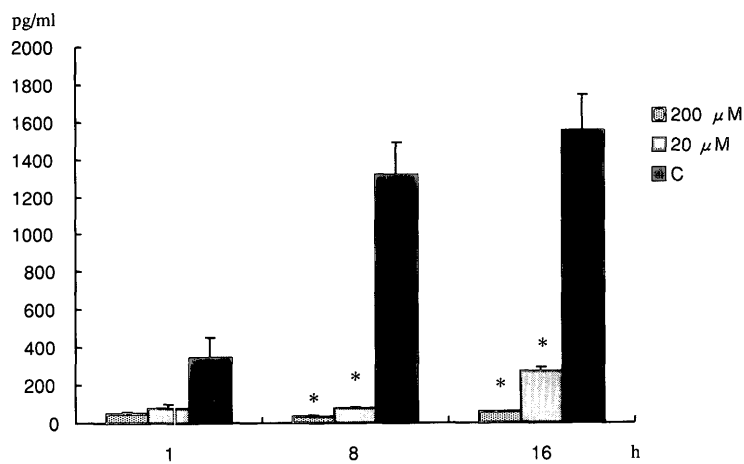


図10 エトドラク投与下におけるPGの遊離は、各時間ともコントロールにくらべ著明にPGの遊離が抑制された。（*： $p < 0.05$ ）

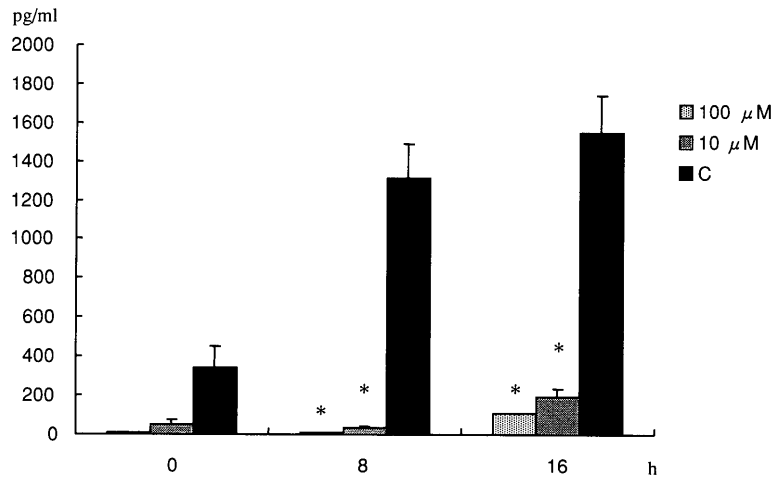


図11 スリダク投与下におけるPGの遊離は、各時間ともコントロールにくらべ著明にPGの遊離が抑制された。（*：p < 0.05）

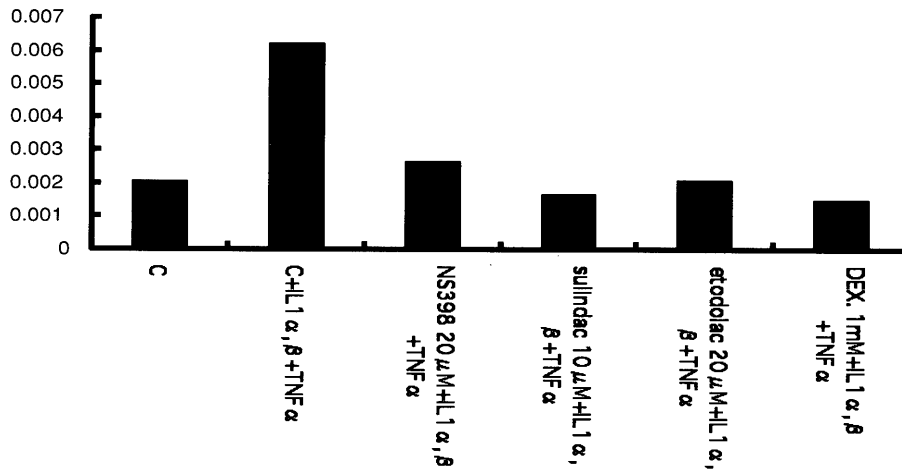


図12 デキサメタゾンならびにNSAIDはHGF mRNAの発現を抑制した。

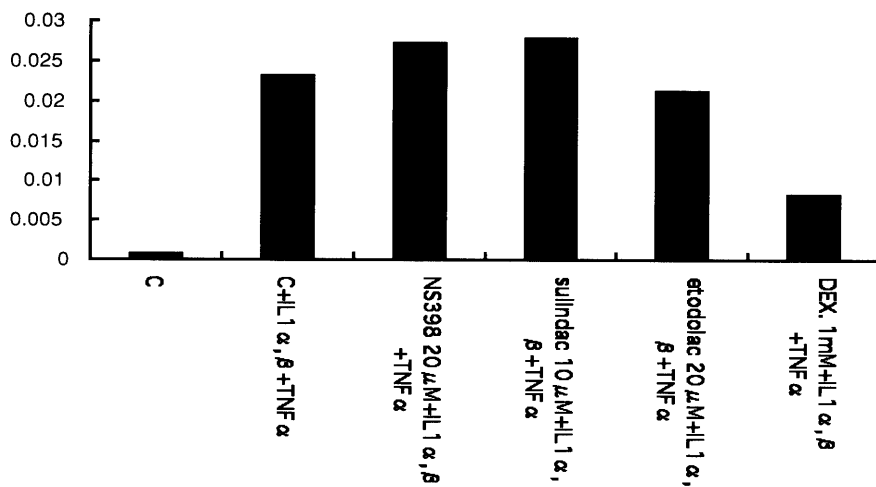


図13 デキサメタゾンはCOX2 mRNAの発現を抑制したが、NSAIDはCOX2 mRNAの発現を抑制しなかった。

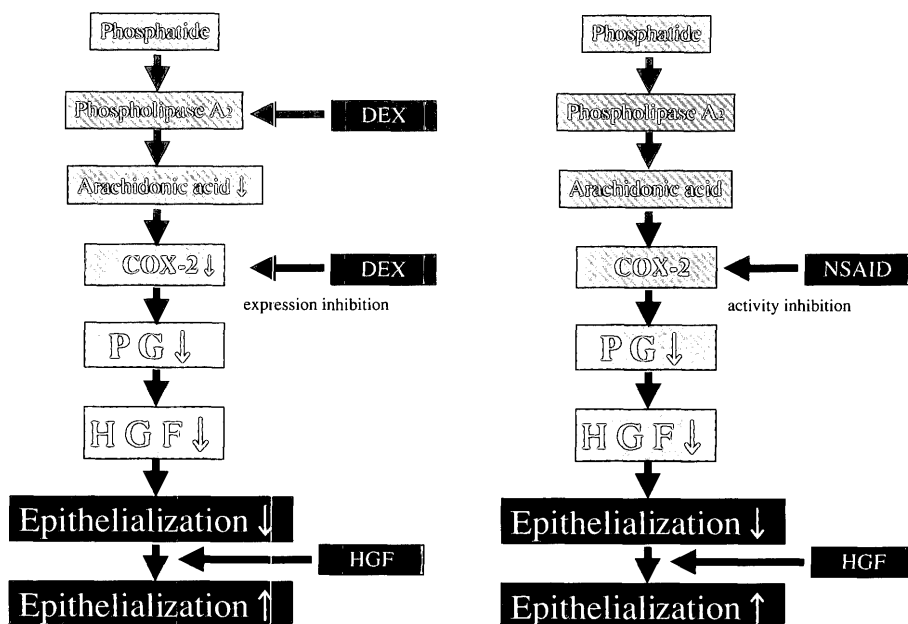


図14 デキサメタゾンと NSAIDsが食道粘膜修復を抑制するメカニズムに関する仮説

で染まることに対応する。我々が用いた食道粘膜上皮細胞は細胞内にPAS陽性の物質を含んでおり、それはアミラーゼ処理により、PASで染まらなくなる。したがって、物質はグリコーゲンであり、この細胞は成熟した角質層にある食道上皮細胞に相当すると考えられた^{23, 26)}。またこの初代培養は一定時間培養していると上皮細胞は死滅し、線維芽細胞のみ生き残った。この細胞は紡錘型をしており、ビメンチン陽性で、サイトケラチン陰性であるため、線維芽細胞または筋線維芽細胞であるが、本質的には同じものであるため、ここでは線維芽細胞として記載した²³⁾。また、今回我々が使用した食道上皮細胞と線維芽細胞の円形欠損修復モデルに関し、修復は36時間程度までは細胞の遊走のみを反映する。その後、欠損からやや離れた部位で増殖が散見されるようになる^{23, 27)}。今回の系では24時間までの実験で終了しているため遊走のみが関与した修復である。

今回の研究結果では、細胞修復とPGの遊離は、各薬剤によって有意に抑制された。しかし各薬剤による細胞修復の抑制程度とPG遊離の抑制程度に解離がみられる。この理由として、今回我々は、primary cultureを10数回行なったが、修復の実験、PG遊離の実験、HGFによる修復回復の実験、mRNA発現の実験は、それぞれ違う時期に調整したprimary cultureを使用している。各実験で同じ傾向で再現性を認めるものの、各primary culture間では差を認めた。これに関しては、primary cultureの出来具合にばらつきがあることが考えられる。完全に同条件のprimary cultureを作製するには限界があ

り、今回、各実験間で違うprimary cultureを使用したため修復とPG遊離にdiscrepancyがみられた可能性が考えられる。

また、NSAIDsの種類により修復の抑制程度は変わらなかった。つまり今回COX-1、COX-2に選択性に関して、選択性のないスリダク、COX-2に選択性のあるエトドラク、およびNS-398の3種のNSAIDsを用いたが、COX-2選択性にかかわらず修復は同様に抑制された。一般に消化管の粘膜保護にはCOX-1が重要な役割を担っているとされる。一方、COX-2は炎症にかかわっているとされる。したがってCOX-2選択性のNSAIDsは粘膜障害が少ないとされている。しかし今回の結果はCOX-2も粘膜防御に重要な役割を担っていることを示す。これは、胃粘膜修復にCOX-2が重要であるというMiyakeらの報告と一致する²⁸⁾。

一般にステロイドによる胃粘膜傷害は知られているが、今回我々はステロイドの食道粘膜修復への影響を見たいという意味合いで、デキサメタゾンを使用した。実際ステロイド使用者にGastro esophageal reflux disease (GERD)が多いという報告もある^{29, 30)}。そのメカニズムとして今回の我々が検証した結果が関連している可能性もある。

また我々は粘膜修復において、粘膜障害→COX-2発現→PG産生→HGF発現→修復という一連の過程を仮説として提唱してきた^{22, 23)}(図14)。この過程のどこか1ヶ所でも阻害された時に修復は抑制される可能性がある。今回の研究結果では、デキサメタゾンは、上皮修復

と平行して、濃度依存的にPGの遊離を抑制した。デキサメゾンには、NF- κ -B活性化を抑制することが報告されている^{31~33)}。このことよりCOX-2発現が抑制されることが予想される。またPGE₂の合成にはホスホリパーゼA2が関与していることは知られており、デキサメゾンはこれを阻害することによってPGの合成を抑制する。いずれにせよPG産生、HGF発現が抑制され、修復が抑制されることになる。もちろんNSAIDsの場合はCOX-2発現を直接的には抑制しないがCOX-2活性は阻害することが知られている。したがってPG産生が抑制されることにより、HGF発現が阻害され、修復が抑制されたことになる。

結 論

今回の検討により食道上皮細胞の修復においてCOX-2発現→PG産生→HGF産生→修復という一連の過程が示唆された。この過程はデキサメゾンによりCOX-2の発現が抑制され、またNSAIDsによってPG産生が抑制されることにより食道上皮細胞の修復が阻害されたものと考えられた。

謝 辞 稿を終えるにあたり、終始協力してくれた獨協医科大学越谷病院消化器内科教室員各位、島村幸恵さん、中川俊夫氏に深謝致します。なお、本論文の論旨の一部を2001年 American Gastroenterological Associationにて発表した。

文 献

- 1) Sontag SJ, Robinson M, Roufail W, et al : Daily omeprazole surpasses intermittent dosing in preventing relapse of oesophagitis : a US multi-centre double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther.*, **11** : 373-380, 1997.
- 2) Hegarty JH, Halvorsen L, Hazenberg BP, et al : Prevention of relapse in reflux esophagitis : a placebo controlled study of ranitidine 150 mg bid and 300 mg bid. *Can J Gastroenterol.*, **11** : 83-88, 1997.
- 3) Robinson M, Lanza F, Avner D, et al : Effective maintenance treatment of reflux esophagitis with low-dose lansoprazole. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.*, **124** : 859-867, 1996.
- 4) Laursen LS, Havelund T, Bondesen S, et al : Omeprazole in the long-term treatment of gastro-oesophageal reflux disease. A double-blind randomized dose-finding study. *Scand J Gastroenterol.*, **30** : 839-846, 1995.
- 5) Bate CM, Booth SN, Crowe JP, et al : Omeprazole 10 mg or 20 mg once daily in the prevention of recurrence of reflux oesophagitis. Solo Investigator Group. *Gut.*, **36** : 492-498, 1995.
- 6) Sarr MG, Hamilton SR, Marrone GC et al : Barrett's esophagus : its prevalence and association with adenocarcinoma in patients with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Surg.*, **149** : 187-193, 1985.
- 7) Winters C, Spurling TJ, Chobanian SJ et al : Barrett's esophagus : a prevalent occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.*, **92** : 118-124, 1987.
- 8) Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ et al : Prevalence of columnar-lined (Barrett's esophagus). *Gastroenterology.*, **99** : 918-922, 1990.
- 9) Cameron AJ, Lomboy CT. : Barrett's esophagus : age, prevalence, and extent of columnar epithelium. *Gastroenterology.*, **103** : 1241-1245, 1992.
- 10) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. : Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer.*, **83** : 2049-2053, 1998.
- 11) Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, et al : Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology.*, **104** : 510-513, 1993.
- 12) Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. : Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma : an update. *JAMA.*, **270** : 1320, 1993.
- 13) 熊谷義也, ほか : Barrett上皮の頻度と成因について. *Prog Digest Endosc.*, **27** : 80-83, 1985.
- 14) 西 隆之, ほか : 内視鏡スクリーニングで発見された Barrett食道・Barrett上皮について. *クリニカ*, **23** (Suppl) : 14-19, 1996.
- 15) 星原芳雄, 山本敬, 橋本光代ほか : 狭い short segment Barrett's esophagusに発生した Barrett腺癌の1例. *胃と腸*, **34** (2) : 195-198, 1999.
- 16) Mc Ardle JE, Lewin KL, Randell G et al : Distribution of dysplasias and early invasive carcinoma in Barrett's esophagus. *Human Pathol.*, **23** : 479-482, 1992.
- 17) Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG et al : Risk factors for erosive reflux esophagitis : a case-control study. *Am J Gastroenterol.*, **96** : 41-46, 2001.
- 18) Lanas A, Hirschowitz BI. : Significant role of aspirin use in patients with esophagitis. *J Clin Gastroenterol.*, **13** : 622-627, 1991.
- 19) Wilkins WE, Ridley MG, Pozniak AL. Benign stricture of the oesophagus : role of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut.*, **25** : 478-480, 1984.

- 20) El-Serag HB, Sonnenberg A. Association of esophagitis and esophageal strictures with diseases treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Gastroenterol.*, **92** : 52-56, 1997.
- 21) 高田博信, 高橋盛男, 桑山 肇 : 培養円柱上皮と扁平上皮修復における酸の影響と Barrett 上皮形成メカニズム. *消化器医学*, Vol.1 : 22~25, 2003.
- 22) Takahashi M, Ota S, Hata Y. et al : Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. *J. Clin. Invest.*, **98** : 2604-2611, 1996.
- 23) Takahashi M, Ota S, Ogura K et al : Hepatocyte growth factor stimulates wound repair of the rabbit esophageal epithelial cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216** : 298-305, 1995.
- 24) 永野麻奈美, 安藤俊哉 : TacMan ケミストリによる定量的 PCR と SNP の解析. *細胞工学別冊 DNA マイクロアレイと最新 PCR 法*. 秀潤社, 113-123, 2000.
- 25) 矢嶋知己, 平田公一, 渡辺直樹 : TaqMan PCR 法の実際. *Medical Technology*, 29 巻 4 号, Page 443-447, 2001.
- 26) 高橋盛男ほか : 食道粘膜の損傷修復メカニズム. *G.I Research*, vol.6 no. 6 : 430~436, 1998.
- 27) Takahashi M, Ota S, Shimada T, et al : Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. *J Clin Invest.*, **95** : 1994-2003, 1995.
- 28) Miyake K, Tsukui T, Wada K et al : Irritant-induced cyclooxygenase-2 is involved in the defense mechanism of the gastric mucosa in mice. *J Gastroenterol.*, **37** : 164-171, 2002.
- 29) Lazenby JP, Guzzo MR, Harding SM, et al : Oral corticosteroids increase esophageal acid contact times in patients with stable asthma. *Chest.*, **121** : 625-34, 2002.
- 30) Shapiro GG, Christie DL : Gastroesophageal reflux in steroid-dependent asthmatic youths. *Pediatrics.*, **63** : 207-212, 1979.
- 31) Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, et al : Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.*, **63** : 1709-1716, 2002.
- 32) Beppu M, Ikebe T, Shirasuna K : The inhibitory effects of immunosuppressive factors, dexamethasone and interleukin-4, on NF-kappaB-mediated protease production by oral cancer. *Biochim Biophys Acta.*, **1586** : 11-22, 2002.
- 33) Vancurova I, Bellani P, Davidson D : Activation of nuclear factor-kappaB and its suppression by dexamethasone in polymorphonuclear leukocytes : newborn versus adult. *Pediatr Res.*, **49** : 257-262, 2001.

Effect of Nsaid on Restitution of Esophageal Cells and Role of Hepatocyte Growth Factor

Hironobu Takada, Morio Takahashi, Shigeki Oka

Department of Gastroenterology and Hepatology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, Japan

BACKGROUNDS : Repeated wounding and healing at the esophago-gastric junction may be a cause of Barrett esophagus. Therefore, the mechanism of wound healing of gastric epithelial cells and esophageal cells may be important for the understanding Barrett esophagus development. We have previously shown that hepatocyte growth factor (HGF) plays a role in esophageal epithelial restitution, using in vitro cultured cells. We have also demonstrated that the source of HGF is esophageal fibroblasts and the prostaglandin E (PGE) induces HGF production by the fibroblasts. In the present study, we investigated the effect of dexamethasone and NSAID on fibroblast PGE and HGF production and on cell restitution in the round wound restitution model. **METHODS** : 1. Primary culture of esophageal epithelial cells and fibroblasts were prepared from rabbit esophagus, after enzyme digestion. 2. Restitution was assessed by a round wound restitution model of cultured cells. The monolayer was wounded with a custom-made scraper which produced a round wound of 1.0 mm in diameter. The sizes of denuded areas were measured

over time, after incubation with or without dexamethasone and NSAIDs. 3. Total cellular RNA was extracted from the cells. TaqMan RT-PCR was performed to quantitate HGF and COX-2 mRNA expression. 4. PGE2 was measured by ELISA. **RESULTS** : 1. Dexamethasone, etodolac, sulindac sulfide, and NS 398 (NSAID) inhibited the restitution of co-culture of esophageal epithelial cells and fibroblasts, which was reversed by HGF. 2. Dexamethasone and NSAID inhibited the production of PGE2, as assessed by ELISA. 3. Dexamethasone inhibited the expression of COX-2 mRNA but NSAID did not. 5. Dexamethasone and NSAID both inhibited HGF mRNA expression. **CONCLUSION** : These results suggest a sequence of cell repair process in esophageal cells ; namely, COX-2 -- PG -- HGF -- Restitution. This sequence is inhibited by dexamethasone via inhibition of COX-2 expression, and by NSAID via inhibition of PG production.

Key Words : Esophageal restitution, Dexamethasone, NSAIDs, COX-2, HGF